

dr hab. Joanna Nynca  
Tel. (+48 89) 539-31-34  
Fax: (+48 89) 524-01-24  
e-mail: [j.nynca@pan.olsztyn.pl](mailto:j.nynca@pan.olsztyn.pl)

Olsztyn, 14.09.2023

## RECENZJA

### ROZPRAWY DOKTORSKIEJ MGR LIGII PANASIAK z tytułu „Zmiany długości telomerowego DNA i aktywności telomerazy u diploidalnych i triploidalnych pstrągów tęczowych (*Oncorhynchus mykiss*)”

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Ligii Panasiak pt. „Zmiany długości telomerowego DNA i aktywności telomerazy u diploidalnych i triploidalnych pstrągów tęczowych (*Oncorhynchus mykiss*)” wykonana została pod opieką promotora naukowego dr hab. inż. Konrada Ocalewicza, prof. UG w Katedrze Biologii Morza i Biotechnologii na Wydziale Oceanografii i Geografii Uniwersytetu Gdańskiego. Badania do pracy realizowano w ramach projektu OPUS14 (2017/27B/NZ9/00113) pt. „Dynamika telomerazy i telomerowego DNA u pstrągów tęczowych z zaburzeniami wzrostu i zakłóconym procesem rozwoju gonad” finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

Podstawą ocenianej pracy doktorskiej są cztery spójne tematycznie, oryginalne prace badawcze oraz poprzedzające je zwięzłe, anglojęzyczne oraz polskojęzyczne opracowanie składające się ze streszczenia, wstępu, celów badań i hipotez badawczych, zadań badawczych, weryfikacji hipotez, wykazu stosowanych metod, podsumowania, wniosków oraz bibliografii. Publikacje zostały opublikowane w latach 2020-2023 w recenzowanych, renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym z listy Journal Citation Reports (JCR; *Genes* IF<sub>2020</sub> 4,096, MEiN=100; *Journal of Applied Genetics* IF<sub>2022</sub> 2,4, MEiN=140; *Zebrafish* IF<sub>2022</sub> 2, MEiN=100; *Cells* IF<sub>2023</sub> 6, MEiN=140), co wskazuje, iż weryfikacja założonych hipotez była też dokonana na poziomie edytorów czasopism. We wszystkich publikacjach Pani mgr Ligia Panasiak jest pierwszym autorem a Jej znaczący wkład w ich powstanie nie budzi wątpliwości. Stosowne oświadczenia wszystkich współautorów potwierdzające wiodący udział Doktorantki w prowadzenie badań, opracowanie wyników oraz przygotowanie manuskryptów zostały dołączone do rozprawy doktorskiej.

Publikacje stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej są spójne tematycznie i skupiają się na analizie zmian aktywności telomerazy oraz długości telomerowego DNA u pstrąga tęczowego.

Podjęta przez Doktorantkę tematyka badawcza jest w pełni uzasadniona i jest kontynuacją tematyki badawczej promotora pracy dr hab. inż. Konrada Ocalewicza.

Wiodącym tematem rozprawy doktorskiej jest charakterystyka zmian długości telomerowego DNA oraz aktywności telomerazy w różnych tkankach pstrąga tęczowego. Opisano dynamikę zmian długości telomerowego DNA w trakcie rozwoju osobniczego w komórkach diploidalnych i triploidalnych pstrągów tęczowych oraz określono aktywność telomerazy w prawidłowo zbudowanych jajnikach osobników diploidalnych i niedorozwiniętych jajnikach sterylnych triploidów. Ponadto przeprowadzono analizę długości telomerowego DNA i aktywności telomerazy u pstrągów tęczowych charakteryzujących się zaburzeniami procesu wzrostu (karłowatość).

Telomery to znajdujące się na końcach chromosomów eukariotycznych niekodujące regiony genomu składające się z krótkich i powtarzalnych sekwencji DNA oraz białek. Podczas każdego podziału komórkowego telomery ulegają skracaniu, co jest związane z procesem starzenia się organizmu. Wykazano, że stres oksydacyjny jest jednym z czynników przyspieszających tempo skracania się telomerów. Telomeraza jest rybonukleinowym enzymem, który odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu długości i integralności telomerów, spowalniając lub zapobiegając ich skracaniu, poprzez syntezę sekwencji telomerowego DNA. Telomeraza składa się z podjednostki katalitycznej *Tert* oraz podjednostki TERC. Regulacja transkrypcji genu *Tert* jest jednym z podstawowych mechanizmów regulujących aktywność telomerazy. U ryb dynamika zmian długości telomerowego DNA jest zróżnicowana gatunkowo i nie zawsze telomery skracają się wraz z wiekiem. W przeciwieństwie do ssaków, u ryb telomeraza jest aktywna w komórkach wszystkich tkanek, także u osobników dorosłych. Poziom aktywności telomerazy jest znacznie wyższy w komórkach młodych i szybko rosnących osobników, w tkankach gonadalnych oraz w regenerujących się tkankach, natomiast wraz z wiekiem ulega obniżeniu. Pogłębienie wiedzy dotyczącej roli telomerazy i telomerowego DNA w procesach wzrostu, starzenia się oraz regeneracji jest kluczowe dla lepszego zrozumienia tych aspektów u hodowlanych gatunków ryb, takich jak pstrąg tęczowy. W tej grupie ryb często można zaobserwować znaczną liczbę osobników cierpiących na zaburzenia wzrostu, takie jak karłowatość, a procesy regeneracji naturalnie zachodzą w gonadach zarówno przed, jak również po tarle. Ponadto, uzyskane w procesie triploidyacji osobniki pstrąga tęczowego posiadające dodatkowy zestaw chromosomów, charakteryzujące się unikalnymi cechami genetycznymi i fizjologicznymi (większe rozmiary komórek, wyższa heterozygotyczność, ciągły wzrost, sterylność, silnie zredukowane jajniki) wydają się być bardzo dobrym modelem i dopełnieniem kompleksowych badań dotyczących charakterystyki telomerowego DNA oraz aktywności telomerazy u tego gatunku.

Przekonuje to o zasadności sformułowanych hipotez badawczych oraz celów przedstawionej do oceny pracy doktorskiej. Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Ligii Panasiak doskonale wpisuje się w opisaną problematykę, a zagadnienia poruszane przez Doktorantkę w rozprawie są niezwykle aktualne. Wyniki badań Doktorantki dotyczące zmiany aktywności telomerazy i długości telomerowego DNA u pstrągów tęczy w zależności od płci, wykazujących różne tempo wzrostu, oraz obserwowanych w komórkach prawidłowo i nieprawidłowo zbudowanych gonad, pozwalają na bardziej kompleksowe zrozumienie molekularnych mechanizmów kontrolujących tempo wzrostu, procesy starzenia się, dojrzewanie płciowe oraz regenerację układu rozrodczego u ryb łososiowatych. Doktorantka wykazała, że (i) proces triploidyzacji nie wpływa znacząco na dynamikę zmian długości telomerowego DNA w trakcie ontogenezy, (ii) zaburzenie wzrostu (karłowatość) nie ma odzwierciedlenia w zmianach długości telomerów oraz aktywności telomerazy, (iii) płeć nie ma wpływu na długość sekwencji telomerowej, (iv) silnie zredukowane jajniki triploidalnych pstrągów tęczy charakteryzują się niższą aktywnością telomerazy, natomiast aktywność telomerazy w komórkach somatycznych triploidów jest wyższa w porównaniu do osobników diploidalnych. Dane przedstawione w publikacjach mają charakter nowatorski. Publikacje stanowiące przedłożoną do recenzji rozprawę doktorską były już recenzowane. Strona merytoryczna i wartość naukowa uzyskanych wyników była wnikliwie oceniana przez recenzentów i edytorów czasopism, którzy zaakceptowali prace do druku, co znacznie ułatwia zadanie Recenzentowi pracy doktorskiej. Przedstawione prace eksperymentalne stanowią logiczną całość, cele prac są jasno sprecyzowane, metody i wyniki są opisane szczegółowo, dyskusja jest przeprowadzona w sposób prawidłowy. Wartość poznawcza prac jest bardzo wysoka, o czym świadczy fakt ich opublikowania w renomowanych czasopismach naukowych.

**Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska dobrze prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki w dyscyplinie Nauki o Ziemi i Środowisku.** Ogólna wiedza teoretyczna doktorantki przedstawiona została we Wstępie rozprawy doktorskiej. Wprowadzono czytelnika w zagadnienia związane z pojęciem telomerów i ich funkcji, mechanizmem ich skracania oraz czynnikami odpowiedzialnymi za skracanie się telomerów, takich jak stres oksydacyjny. Opisano istniejący stan wiedzy na temat zróżnicowanej długości telomerowego DNA u różnych gatunków ryb, jak również dynamiki zmian ich długości w zależności od wieku, płci czy stadium dojrzałości płciowej. W dalszej części Doktorantka opisała rolę oraz budowę telomerazy, kluczowego enzymu odpowiedzialnego za utrzymanie długości telomerów. Scharakteryzowano ekspresję enzymu u organizmów stałocieplnych oraz zmiennocieplnych, takich ryby, opisano konsekwencję wyłączenia

genu podjednostki *Tert* u modelowych gatunków ryb, jak również zależności między długością telomerów i aktywnością telomerazy a masą ciała ryb czy tempem wzrostu. W dalszej kolejności Doktorantka wprowadziła pojęcie triploidyzacji ryb i wskazuje zalety osobników triploidalnych jako modelu do analizy zmian telomerowego DNA. Uzyskane wyniki potwierdzają trafność sformułowanych hipotez badawczych i celów pracy doktorskiej, co dodatkowo podkreśla biegłość Doktorantki w dziedzinie tematu jej rozprawy doktorskiej. Ponadto, jej wiedza teoretyczna została jasno wykazana w analizie uzyskanych wyników, które były kompleksowe i trafne.

**W mojej ocenie, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska wskazuje na umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez Doktorantkę.**

Wskazują na to:

1) Dobrze zaplanowany układ doświadczalny.

Nie mam uwag do utworzonych grup badawczych w celu weryfikacji postawionych hipotez. W celu weryfikacji hipotezy nr 1 Doktorantka wykorzystwała do badań materiał badawczy pobrany na różnych stadiach rozwoju od diploidalnych oraz triploidalnych osobników: zarodki, larwy, osobniki jednoroczne, dwuletnie, trzyletnie oraz w celu weryfikacji hipotezy nr 3 pobrano różne tkanki (wątroba, śledziona, skrzela, mięśnie, jajniki) od dwuletnich oraz trzyletnich diploidów oraz triploidów. W celu potwierdzenia hipotezy nr 2 pobrano materiał badawczy od jednorocznych ryb androgenetycznych charakteryzujących się prawidłowym wzrostem oraz androgenetycznych osobników karłowatych. Poprawnie dobrano liczebność w grupach, tak aby przeprowadzić analizę statystyczną uzyskanych wyników.

2) Różnorodny warsztat badawczy.

Na uwagę zasługuje poprawność dobranych analiz oraz ich różnorodność. Do analizy długości telomerów wykorzystano technikę Q-FISH. W celu oszacowania długości telomerowego DNA porównano intensywność fluorescencji sygnałów hybrydyzacji w badanych komórkach pstrąga tęczowego oraz wyhodowanej linii komórkowej (mysie komórki chłoniaka) o znanej długości telomerów. Aktywność telomerazy w komórkach oznaczono metodą ELISA. W celu zbadania ekspresji genu *Tert* zastosowano metody biologii molekularnej (izolacja RNA, odwrotna transkrypcja, real-time PCR).

3) Poprawna interpretacja i dyskusja wyników.

W oparciu o logicznie zdefiniowane cele i postawione hipotezy uzyskano wyniki, które dostarczyły nowych informacji na temat dynamiki zmian długości telomerowego DNA i aktywności telomerazy w komórkach diploidalnych i triploidalnych pstrągów tęczowych, w zależności od ich

stanu fizjologicznego, wieku oraz stopnia rozwoju układu rozrodczego. Doktorantka dyskutuje uzyskane wyniki bazując na dostępnej literaturze dotyczącej telomerowego DNA oraz aktywności telomerazy nie tylko u ryb. Moim zdaniem dyskusja jest wszechstronna i prawidłowa.

**Podczas szczegółowej analizy pracy nasunęły mi się uwagi i pytania. Najistotniejsze z nich przedstawiam poniżej z prośbą o wyjaśnienie lub komentarz.**

1. Do pomiaru długości telomerowego DNA stosuję się różne metody, obok użytej przez Doktorantkę Q-FISH, stosuje się również Q-PCR, TRF, STELA, TeSla. Dlaczego Doktorantka wybrała metodę Q-FISH. We wstępie brakuje informacji o zaletach i specyfice zastosowanej metody Q-FISH na tle innych metod.

2. Stres oksydacyjny jest ważnym czynnikiem przyspieszającym tempo skracania się telomerów. Doktorantka wykazała wyższą aktywność telomerazy w tkankach somatycznych osobników triploidalnych w porównaniu do diploidalnych i wskazuje na związek uzyskanych wyników ze stresem oksydacyjnym. Szkoda, że Doktorantka nie pokusiła się o zgłębienie tego tematu i wykonanie dodatkowych badań, obejmujących, np. pomiar całkowitej zdolności przeciwutleniającej (TAC) lub pomiar aktywności poszczególnych enzymów we krwi lub sprawdzenie ekspresji genów stresu oksydacyjnego np. dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza, peroksydaza glutationowa czy reduktaza glutationowa.

3. W niniejszej rozprawie doktorskiej wykazano, że jajniki triploidalnych osobników charakteryzują się niższą aktywnością telomerazy w porównaniu do osobników diploidalnych. Doktorantka wskazuje, że m.in. niedobór estradiolu może być odpowiedzialny za obniżoną ekspresję genu *Tert*. Zasadne zatem byłoby przeprowadzenie pomiaru estradiolu u triploidów i diploidów w celu potwierdzenia przypuszczenia.

4. Jakimi kryteriami kierowała się Doktorantka przy wyborze wieku osobników charakteryzujących się niedoborem wzrostu oraz prawidłowo rozwijających się osobników? Do sprawdzenia wpływu niedoboru wzrostu na długość telomerowego DNA oraz na aktywność telomerazy wybrano osobniki jednoroczne, a nie starsze. U osobników starszych można oznaczyć poziom estradiolu, który wykazując działanie antyoksydacyjne, może mieć wpływ na długość telomerów.

5. Zastanawia mnie dobór genu referencyjnego (Publikacja nr 4). Czy stosowano tylko jeden gen referencyjny ( $\beta$ -aktyna)? Czy analizowano stabilność innych genów referencyjnych, tj. *gapdh*

(dehydrogenaza aldehydu 3- fosfoglicerynowego) lub elongation factor 1 (*ef1*). Rutynowo sprawdza się kilka genów referencyjnych przed właściwą analizą.

6. Cele badań są dla mnie tożsame z zadaniami badawczymi, proponowałabym opisać bardziej szczegółowo zadania badawcze.

7. W wykazie stosowanych metod brakuje wzmianki o przeprowadzeniu procesu androgenyzy oraz histologii.

8. W niniejszej pracy wykazano, że telomeraza bierze udział procesach związanych z rozwojem gonad, a obniżony poziom ekspresji genu *Tert* obserwowano w silnie zredukowanych jajnikach triploidalnych samic. Uzyskane wyniki są potwierdzeniem wyników uzyskanych w pracy "Ovarian transcriptome analysis of diploid and triploid rainbow trout revealed new pathways related to gonadal development and fertility" (doi: 10.1016/j.animal.2022.100594). We wspomnianej pracy ekspresja *Tert* była znacząco niższa w jajnikach triploidalnych dwuletnich samic pstrąga tęczowego. Zabrakło mi tej informacji w dyskusji przedłożonej do recenzji pracy doktorskiej dotyczącej porównania ekspresji *Tert* w jajnikach diploidów oraz triploidów pstrąga tęczowego.

9. Uważam, że wstęp powinien być bardziej dopracowany, a zastosowanie większej ilości śródtytułów, które oddzielałyby tematycznie akapity poprawiłyby jego przejrzystość. Dodatkowo, fragment wstępu dotyczący m.in. zmian długości telomerowego DNA u różnych gatunków ryb mógłby być przedstawiony w formie tabeli, która zestawiałaby i pomogła uporządkować różnorodne specyficzne gatunkowo wyniki. Ponadto warto byłoby wspomnieć w tej części rozprawy o możliwym aplikacyjnym wykorzystaniu pomiaru aktywności telomerazy w praktyce, w celu opracowania potencjalnych testów diagnostycznych, np. umożliwiających przeżyciowe określenia stopnia rozwoju gonad ryb.

10. Nie do końca rozumiem stwierdzenie, że osobniki triploidalne charakteryzują się większą podatnością na czynniki zewnętrzne w porównaniu do osobników diploidalnych i są bardziej wymagające w kontekście odpowiednich warunków środowiskowych (strona 37). Proszę o komentarz.

11. Opracowanie jest przygotowane w sposób staranny, chociaż nie jest wolne od drobnych błędów, np. izotiocyjanianem (strona 31, 41), zamiast izotiocyjanianem. „In polish” zamiast „in Polish” (strona 4), które nie umniejszają jednak w żaden sposób wartości przedstawionej dysertacji i nie wpływają na jej ocenę.

## WNIOSEK KOŃCOWY

Uważam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska umożliwiła Doktorantce wszechstronne, praktyczne opanowanie metod i technik pracy badawczej, znajomość przedmiotowego piśmiennictwa oraz weryfikację postawionych hipotez badawczych, poprzez prawidłowe wykorzystanie technik badawczych, poprawnego wnioskowania oraz przygotowania publikacji co predysponują ją do dalszej pracy naukowej. Jednoznacznie Doktorantka uzyskała nową wiedzę dotyczącą wpływu triploidyzacji oraz zaburzeń wzrostu na zmiany długości telomerowego DNA oraz na aktywność telomerazy u ważnego gospodarczo gatunku, jakim jest pstrąg tęczy.

Pozytywnie oceniam przedstawioną do recenzji rozprawę doktorską. Ponadto stwierdzam, iż przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Ligii Panasiak odpowiada warunkom określonym w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023r poz. 742 ze zm.). W związku z powyższym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki o Ziemi i Środowisku Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Ligii Panasiak do dalszych etapów postępowania.

Ze względu na znaczącą wartość naukową pracy wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Ligii Panasiak.

Z poważaniem

Joanna Nynca

